

007792580

WPI Acc No: 1989-057692/198908

Stable liposome formulations of medicaments - produced by freezing an aq. dispersion of a liposome contg. a poly-hydric alcohol and/or saccharide(s), and an ion

Patent Assignee: DAIICHI SEIYAKU CO (DAUC)

Number of Countries: 001 Number of Patents: 002

Patent Family:

| Patent No | Kind | Date | Applicat No | Kind | Date | Week |
|------------|------|----------|-------------|------|----------|----------|
| JP 1009931 | A | 19890113 | JP 87166015 | A | 19870702 | 198908 B |
| JP 2501336 | B2 | 19960529 | JP 87166015 | A | 19870702 | 199626 |

Priority Applications (No Type Date): JP 87166015 A 19870702

Patent Details:

| Patent No | Kind | Lan | Pg | Main IPC | Filing Notes |
|-----------|------|-----|----|----------|--------------|
|-----------|------|-----|----|----------|--------------|

| | | | | | |
|------------|---|--|---|--|--|
| JP 1009931 | A | | 6 | | |
|------------|---|--|---|--|--|

| | | | | | |
|------------|----|---|--------------|----------------------------------|--|
| JP 2501336 | B2 | 4 | A61K-009/127 | Previous Publ. patent JP 1009931 | |
|------------|----|---|--------------|----------------------------------|--|

Abstract (Basic): JP 1009931 A

Liposome formulation is produced by freezing an aq. dispersion of a liposome which contains polyhydric alcohol (e.g. glycerol, propylene glycol, polyethylene glycol) and/or saccharides (e.g., lactose, trehalose, maltose, mannitol), and an ion (e.g., monovalent cation or anion) at an ionic concn. of about 20 mM or below.

Pref. the lamella component of liposome (e.g. phospholipid, glycolipid, dialkyl-type synthetic surfactant), if required together with a drug (e.g., anti-cancers, antibiotics, enzymes, BRM, etc.), is dissolved in an organic solvent (e.g. chloroform) and the solvent is removed to give lipid film. This is suspended in water and polyhydric alcohol and/or saccharides are added. Then the pH is adjusted near to neutral (pref., pH=6-8) with monovalent strong alkali (e.g., KOH, NaOH) or acid (e.g. HCl, HNO3) to give an aq. dispersion of liposome where the final ionic concn. is 20mM or below. Thus obtained suspension is cooled down gradually to -20 deg.C in a freezer or quickly to -70 deg.C in e.g., acetone-dry ice to give a liposome formulation.

USE/ADVANTAGE - The formulations are very stable. No change in appearance and no or little change in particle size was observed even after storage at -20 deg.C for a long period (1 year, 1 year 5 months or 2 years 7 months).

(Dwg. 0/0)

Derwent Class: A96: B07

International Patent Class (Main): A61K-009/127

International Patent Class (Additional): A61K-009/10; A61K-009/19;

A61K-047/10

⑫ 公開特許公報(A)

昭64-9931

⑪ Int. Cl.

A 61 K 9/10
9/14

識別記号

3 2 7

庁内整理番号

D-6742-4C
F-6742-4C

⑬ 公開 昭和64年(1989)1月13日

審査請求 未請求 発明の数 1 (全6頁)

⑭ 発明の名称 安定なリボソーム製剤

⑮ 特 願 昭62-166015

⑯ 出 願 昭62(1987)7月2日

特許法第30条第1項適用 昭和62年4月4日 京都国際会館において開催された「日本薬学会第107年会シンポジウム」で発表

⑰ 発 明 者 菊 池 寛 東京都江戸川区北葛西1丁目16番13号 第一製薬中央研究所内
⑱ 発 明 者 広 田 貞 雄 東京都江戸川区北葛西1丁目16番13号 第一製薬中央研究所内
⑲ 発 明 者 山 内 仁 史 東京都江戸川区北葛西1丁目16番13号 第一製薬中央研究所内
⑳ 出 願 人 第一製薬株式会社 東京都中央区日本橋3丁目14番10号

明 細 書

1. 発明の名称

安定なリボソーム製剤

2. 特許請求の範囲

多価アルコール及び/又は糖類を含有させ、且つイオン濃度を約20mM以下としたリボソームの水分散液を凍結して製したリボソーム製剤

3. 発明の詳細な説明

<産業上の利用分野>

本発明は、多価アルコール及び/又は糖類を含有させ、且つイオン濃度を約20mM以下としたリボソームの水分散液を凍結して製したリボソーム製剤に関する。本発明のリボソーム製剤は優れた安定性を示し、医療上有用なものである。

<従来の技術>

リボソームの構造は、熱力学的には安定なものではない場合が多く、懸濁液として調製しても、通常はリボソーム粒子同士の凝集、融合、更には沈殿物の生成や不溶物の析出が比較的速やかに生じてしまうことが知られている。即ち、凝集や融

合等により、リボソームのみかけの粒子径が変化すれば、それに伴って体内動態の変化、薬効発現の変化等が起こることが当然予想される。従って多くの研究者によりリボソームの臨床への応用研究がなされているにもかかわらず、いまだかつて大規模なリボソーム製剤が商品化されえない一つの大きな要因が、このリボソームの製剤としての不安定さにある。

リボソームの水分散液を凍結し、-20℃～-30℃の冷凍庫あるいは冷凍室に保存することを検討したものとしてはCrosselin等の報告【インターナショナル・ジャーナル・オブ・ファーマシューティクス、13、27～35(1985)】や Higgins等の報告【ジャーナル・オブ・ファーマシー・アンド・ファーマコロジー、18、259～263(1986)】をあげることができる。前者では、凍結-融解操作における蛍光色素5-カルボキシフルオレセインのリボソームからの漏れ及び粒子径変化をみている。水系溶媒としては0.01M トリス-塩酸緩衝化生理食塩水(pH 7.4)と各種水溶液(ブドウ糖、乳

糖、ショ糖、グリセリン、マンニトール、ポリエチレングリコール、ポリビニルピロリドン等の水溶液)との1:1の混合液を用い、凍結速度、凍結温度、凍結時間の及ぼす影響を調べている。ここでは凍結速度 1℃/分、凍結温度 -25℃の条件に照って凍結-融解時における薬物の漏れやリボソームの凝集、融合は認められないとされている。ただし、この報告はあくまでリボソーム調製直後における凍結-融解操作での安定性であり、凍結状態のままリボソームを長期保存し、その後融解した時の安定性までは検討されていない。更に Grosselin 等は別の報告 [インターナショナル・ジャーナル・オブ・ファーマシューティクス, 22, 299~310 (1984)] において、ドキシルピシン含有リボソームを 0.01M トリス-塩酸緩衝化生理食塩水 (pH 4) と 0.01M トリス-塩酸緩衝化 5% グコース溶液の混液 (混合比 1:1) に分散し、凍結させて凍結状態 (-30℃) で 2ヵ月間保存後の安定性 (薬物保持率及び粒子径変化) をみている。又、Higgins 等はストレプトマイシン含有リボソ

ームを 0.02M リン酸緩衝化 (pH 6.5) 溶液 (溶質としてジメチルスルホキシド、グリセリン、アラニン、グリシンベタインを用いる) で調製し、凍結-融解操作による薬物のリボソームからの漏れを試験している。結果は良好であったものの、融解後のリボソームは凝集してしまい、みかけの粒子径は大きくなったと報告されている。又、この時溶質としてはショ糖やマンニトール等の糖類を用いると凍結-融解による薬物の漏れが更に著しくなるとされている。尚、この報告においても凍結状態で保存した後の安定性までは試験されていない。

以上の如く、リボソームの凍結-融解における安定性に関する報告は若干なされているものの、半年以上のリボソームの安定性を有するリボソームの凍結製剤は得られていない。

<発明が解決しようとする問題点>

本発明者等は、上記問題を解決すべく鋭意検討した結果、本発明を完成した。

<発明の構成>

本発明は、多価アルコール及び/又は糖類を含む、且つイオン強度が約 20mM 以下としたリボソームの水分散液を凍結して製したリボソーム製剤に関する。

本発明にかかわる多価アルコールとしては、グリセリン、ポリグリセリン、プロピレングリコール、ポリプロピレングリコール、エチレングリコール、トリエチレングリコール、ポリエチレングリコール、ジエチレングリコールモノエチルエーテル、1,3-ブチレングリコール、ペンタエリスリトール等を、好ましくはグリセリン、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール 400、ポリエチレングリコール 600等を例示することができる。これらの多価アルコールの使用量は特に限定されず、通常リボソーム水分散液 1重量部に対し、0.001~2重量部であり、特にプロピレングリコール、グリセリン等の場合には、0.01~0.05重量部程度が好ましい。

又、糖類としては、ブドウ糖、ガラクトース、

マンノース、フルクトース、イノシトール、リボース、キシロース等の単糖類、乳糖、ショ糖、セルビオース、トレハロース、マルトース等の二糖類、ラフィノース、メレジトース等の三糖類、シクロデキストリン等の多糖類、キシリトール、ソルビトール、マンニトール、マルチトール等の糖アルコールを、好ましくは乳糖、トレハロース、マルトース、マンニトール等を例示することができる。これら糖類の使用量は通常リボソーム水分散液 1重量部に対し、0.001~0.3重量部、特に単糖類を使用した場合には、0.01~0.15重量部程度が好ましい。

本発明にかかわるイオンとしては、一価のカチオン又は一価のアニオンが好ましく、その具体例としては、ナトリウムイオン、カリウムイオン、リチウムイオン等のアルカリ金属イオン、トリエチルアンモニウムイオン、トリメチルアンモニウムイオン、ジイソプロパノールアンモニウムイオン、ジエタノールアンモニウムイオン、トリエタノールアンモニウムイオン、テトラエチルアンモ

ニウムイオン、テトラメチルアンモニウムイオン等のアンモニウムイオン、クロルイオン、ニトロニウムイオン、ブロムイオン、ヨウドイオン等を、好ましくはナトリウムイオン、カリウムイオン、クロルイオン、ニトロニウムイオン等をあげることができる。これらのイオンのリボソームの水分散液中における濃度については可及的少量にすることが望ましく、具体的には約20mM以下にすることが必要である。それ以上の濃度では、長期安定性に関し不満足な場合が多い。

次に、本発明のリボソームの凍結製剤の製造法を説明する。即ち、公告の方法〔ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー、Vol.13, 238頁(1965)〕に従いリボソームの膜成分物質をクロロホルム等の適当な有機溶媒に溶解後、溶媒を減圧留去してリビッドフィルムを形成させ、これを水に懸濁させ、次いで多価アルコール及び／又は糖類を添加し、且つ一価の強アルカリ又は一価の強酸でpHを中性付近、好ましくは6〜8程度に調整することにより、リボソームの水分散液を製造

ムの水分散液中のリボソーム以外のイオン濃度については上記のように可及的少量にすることがリボソームの安定性から望ましく、具体的には約20mM濃度以下にすることが必要である。

上記膜成分物質については、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトール、リゾホスファチジルコリン、スフィンゴミエリン、卵黄レシチン、大豆レシチン等に代表されるリン脂質の他、糖脂質、シアルキル型合成界面活性剤等の一種又は二種以上の混合物が主体となる。そして、これに膜安定化剤としてコレステロール、コレスタノール等のステロール類を、荷電物質としてジセチルホスフェート、ホスファチジン酸、ガングリオシド、ステアリアルアミン等を、更に酸化防止剤としてα-トコフェロール等を加えて膜成分物質を形成させても良い。このようなリボソーム膜成分物質の成分の比率は何ら限定されるべきものではないが、好ましくは脂質1重量部に対し、ステロール類を0〜1重量部程度、荷

することができる。又、上記のようにして製したリビッドフィルムを多価アルコール及び／又は糖類を添加した水溶液に懸濁させ、次いで上記のようにpHを中性付近、好ましくは6〜8程度に調整することによってもリボソームの水分散液を製造することができる。得られる水分散液は必要に応じて限外濾過等の手段を用いることによりリボソームの粒径分布をコントロールしてもよい。

上記の一価の強アルカリとしては、水酸化カリウム、水酸化ナトリウム、水酸化リチウムなどの水酸化物の他、トリエチルアミン、トリメチルアミン、ジイソプロパノールアミン、ジエタノールアミン、トリエタノールアミン等の解離度の大きなアミン類、テトラエチルアミン、テトラメチルアミン等の4級アンモニウム等を、好ましくは水酸化カリウム、水酸化ナトリウム等をあげることができる。

又、一価の強酸としては、塩酸、硝酸、臭化水素、ヨウ化水素等を、好ましくは塩酸、硝酸等をあげることができる。最終的に得られるリボソ-

電物質を0〜0.2重量部程度加えるのが適している。

上記の膜成分物質の使用量は特に限定されず、通常水1重量部に対し、0.0001〜0.05重量部、好ましくは0.001〜0.008重量部である。

かくして得られたリボソーム水分散液を冷凍庫中-20℃程度の温度で徐々に凍結させるか、もしくはアセトン-ドライアイス等を用いて-70℃程度の温度で急速に凍結させることにより、目的とする本発明のリボソーム製剤を製造することができる。製されたりボソーム製剤の保存については冷凍庫等を用いれば良い。

本発明のリボソーム製剤を保持させる薬剤としては特に制限はないが、シトシンアラビノシド、メトトレキサート、アドリアマイシンに代表される制癌剤、アムホテリシンB、ゲンタマイシン、ピペラシリン等の抗生物質、グルタチオン等の肝臓病薬、スーパーオキシドジスムターゼ、グルコアミラーゼ等の酵素、インターフェロン、インターロイキン、腫瘍壊死因子(TNF)、上皮成長因子

(EGF)、エリスロポニン等の生理活性物質、プロスタグランジン、ステロイド等のホルモン類、ムラミルジペプチド、ムラミルトリペプチド、リンホカイン、レンチナン等の免疫賦活剤、DNA、RNAの如き核酸類、ビタミンA、C、Kに代表されるビタミン類等の他に、サリチル酸ナトリウム等の一般薬剤をあげることができる。これらの薬剤をリボソーム内に保持させるには以下のようにすれば良い。即ち、薬剤を水に溶解させ、次いでこれにリビッドフィルムを懸濁させれば良く、又、クロロフィル、グラミジジンS、ビタミンA等に代表される膜親和性薬剤については、これを膜成分物質と一緒に有機溶媒中に混合せしめ、次いで溶媒を留去させ、得られるリビッドフィルムを水に懸濁させると保持効率が良い。得られるリボソームの水分散液を上記のような方法で凍結させることにより、薬物を保持したリボソームの凍結製剤を得ることができる。

<発明の効果>

本発明のリボソーム製剤は従来得られなかった

間に保ったまま、ホモミキサー及びバドルミキサーにより十分に攪拌し、室温に戻したところ、ビタミンK₁を保持した淡黄色のリボソームの水分散液(pH 4.57)を得た。

充分窒素バブリングを行ったリボソーム懸濁液を2mlずつ褐色バイアルに分注し、窒素置換を行った後打栓した。これをアセトンドライアイス液で急速に凍結させてリボソーム製剤を得た。

実施例2

実施例1で得られたリボソームの水分散液を、高圧噴射型乳化機(三和機械製、50l/hr)で更に微粒子化した後、実施例1と同様にして凍結させてリボソーム製剤を得た。

実施例3

未水添精製大豆レシチン(リン脂質99%以上)0.92g、コレステロール0.2g、ジセチルホスフェート0.0935gを秤取し、ビーカー内でクロロホルム50mlに溶解せしめた後、50~60℃に加温しながら、窒素ガスで溶媒を除去した。

得られた乾燥ペースト状均一系混合物に、あら

長期間のリボソームの安定性を示すものである。従って、本発明は安定なリボソーム製剤として医療上有用なものである。

<実施例>

次に本発明を実施例及び試験例により説明するが、これらは何ら本発明を限定するものではない。

実施例1

未水添精製大豆レシチン(リン脂質95%以上)30.0g、コレステロール15.0g、ジセチルホスフェート2.2g及びビタミンK₁1.6gを秤取し、アジホモミキサー内でクロロホルム100mlに溶解せしめた後、バドルミキサーによる攪拌を行いながら、窒素ガスを送り溶媒を除去した。この時、液体窒素で冷却したトラップを用いて溶媒をほぼ完全に回収した。この時のアジホモミキサー内の温度は50~60℃の間で行った。

得られた乾燥ペースト状均一系混合物に、あらかじめ60℃に保温した5%マンニット水溶液2000mlを加え、十分に膨潤せしめた。温度を50~60℃の

あらかじめ60℃に保温した5%マンニット水溶液300mlを加え、十分に膨潤せしめた。温度を50~60℃に保ったまま、T.K.ホモミキサーにより十分に攪拌した後、0.1N水酸化ナトリウムでpHを5.15に調整した。この液を更に、0.2μmのメンブランフィルター(富士写真フィルム社製)で押し出し濾過を行い、乳白色のリボソームの水分散液を得た。これをバイアルに2mlずつ分注し、窒素置換を行い打栓した後、-20℃の冷凍庫内に入れ徐々に凍結させてリボソーム製剤を得た。

実施例4

未水添精製大豆レシチン(リン脂質95%以上)0.92g、コレステロール0.2g、ジセチルホスフェート0.0935g、DL-α-トコフェロール0.149gを秤取し、ビーカー内でクロロホルム50mlに溶解せしめた後、50~60℃に加温しながら、窒素ガスで溶媒を除去した。

得られた乾燥ペースト状均一系混合物に、あらかじめ50℃に保温した5%マンニット水溶液300mlを加え、十分に膨潤せしめた。温度を50~60℃に

保ったまま、T.K.ホモミキサーにより充分に攪拌した後、1N水酸化ナトリウムと1Nの塩酸を用いてpHを6.91に調整した。この液を更に、0.22 μ mのメンブランフィルター（ミリポア社製）で押し出し濾過を行い、乳白色のリボソームの水分散液を得た。これをバイアルに2mlずつ分注し、窒素置換を行い打栓した後、実施例1と同様に急速に凍結させてリボソーム製剤を得た。

実施例5

完全水添精製大豆レシチン（リン脂質99%以上）7.37g、コレステロール1.58g、シセチルホスフェート0.74gを秤取し、ビーカー内でクロロホルム50mlに溶解せしめた後、50～80℃に加温しながら、窒素ガスで溶媒を除去した。

得られた乾燥ペースト状均一系混合物に、あらかじめ50℃に保温した2.2%プロピレングリコール水溶液300mlを加え、充分に溶解せしめた。温度を50～60℃の間に保ったまま、T.K.ホモミキサーにより充分に攪拌した後、0.1N水酸化ナトリウムでpH6.8に調整した。この液を0.6 μ mのメンブ

び5 μ mマンニット水溶液100mlを加え、充分に攪拌した後、実施例5と同様に操作し、凍結させてリボソーム製剤を得た。

実施例9

実施例5で得られたリボソームの水分散液を実施例3と同様に操作し、-20℃の冷凍庫で徐々に凍結させてリボソーム製剤を得た。

実施例10

実施例5で得られたリボソームの水分散液を実施例3と同様に操作し、-20℃の冷凍庫で徐々に凍結させてリボソーム製剤を得た。

試験例

実施例1～10で得られたリボソーム製剤を-20℃の冷凍庫内に保存し、外觀変化及び粒径変化を試験した。外觀変化は肉眼により、又、粒径変化は準弾性光散乱法により実施した。

これらの結果を表1に示した。尚、解凍は室温で徐々に行った。

ランフィルター（ミリポア社製）で押し出し濾過を行い、乳白色のリボソームの水分散液を得た。この液50mlに、2.2%プロピレングリコール水溶液50mlを加え、充分に攪拌した後、バイアルに2mlずつ分注し、窒素置換を行い打栓した。これを実施例1と同様に急速に凍結させてリボソーム製剤を得た。

実施例6

実施例5で得た乳白色のリボソームの水分散液250mlに、2.2%プロピレングリコール水溶液175mlを加えた後、実施例5と同様に操作し、凍結させてリボソーム製剤を得た。

実施例7

実施例5で得た乳白色のリボソームの水分散液50mlに、5%マンニット水溶液150mlを加えた後、実施例5と同様に操作し、凍結させてリボソーム製剤を得た。

実施例8

実施例5で得た乳白色のリボソームの水分散液50mlに、2.2%プロピレングリコール水溶液50ml及

表1 リボソーム製剤の性状及び経時変化

| 実施例 | 凍結条件 | 凍結過程 | | | | 解凍保存時 (-20℃) | | | |
|-----|------|-------|-------|--------------|---------------|--------------|-------|-------|---------------|
| | | 凍結時 | | 凍結後 | | 経時経過 | 解凍後 | | 粒径 (nm)* |
| | | 凍結前 | 凍結後 | 凍結前 | 凍結後 | | 凍結前 | 凍結後 | |
| 1 | 急凍結 | 液白色塊状 | 液白色塊状 | 154 \pm 73 | 229 \pm 116 | 1年30月 | 液白色塊状 | 液白色塊状 | 258 \pm 193 |
| 2 | " | " | " | 125 \pm 64 | 230 \pm 235 | " | " | " | 349 \pm 258 |
| 3 | 凍結結 | 白色塊状 | 乳白色塊状 | 175 \pm 54 | 337 \pm 286 | 1年 | 白色塊状 | 乳白色塊状 | 417 \pm 514 |
| 4 | 急凍結 | " | " | 166 \pm 81 | 258 \pm 188 | 2年10月 | " | " | 734 \pm 195 |
| 5 | " | " | " | 162 \pm 70 | 330 \pm 223 | " | " | " | 434 \pm 221 |
| 6 | " | " | " | " | 170 \pm 75 | " | " | " | 738 \pm 82 |
| 7 | " | " | " | " | 423 \pm 370 | " | " | " | 408 \pm 445 |
| 8 | " | " | " | " | 273 \pm 156 | " | " | " | 234 \pm 257 |
| 9 | 凍結結 | " | " | " | 473 \pm 378 | " | " | " | 444 \pm 148 |
| 10 | " | " | " | " | 149 \pm 70 | " | " | " | 738 \pm 188 |

* 平均値 \pm 標準偏差

表 1から明らかなように、本発明のリボソーム製剤は、経時保存後も外観は全く変化がなく、又、粒子径もほとんど変化ないかもしくは問題となる程度の変化は認められなかった。従って、本発明のリボソーム製剤はリボソームの安定性に優れていることが確認された。